

## TRABAJOS ORIGINALES

Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"

# EVALUACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

*Dra. Mercedes Meléndez Minobis, Lic. María Dolores Dujarric Martínez, Lic. Orlando Castellano Benítez, Lic. Aimé Posada García, Téc. Orestes Ponce de León y Dr. Antonio González Griego*

## RESUMEN

Se estudiaron indistintamente, por los métodos de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la técnica de inmunohistoquímica mediante el uso de conjugados enzimáticos con peroxidasa (IP), un total de 100 sueros provenientes de pacientes con enfermedades autoinmunes y personas sanas para la detección de anticuerpos antinucleares (AAN). Los resultados del estudio de cada muestra empleando IFI e IP fueron comparados teniendo en cuenta su positividad o no, así como el patrón de marcaje que presentaron los casos positivos. Los estudios de sensibilidad y especificidad mostraron un elevado índice de confiabilidad. Teniendo en cuenta la elevada concordancia entre los resultados de IFI e IP, se pudo concluir que la aplicación del método de IP para la detección de AAN resulta factible; además, este método posee mayor sensibilidad que IFI y por resultar más económico, se propone que constituya el método de elección.

*Palabras clave:* Anticuerpos antinucleares, inmunoperoxidasa, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia indirecta.

El estudio de los autoanticuerpos tiene una gran importancia tanto en las ciencias básicas como en la práctica médica. Desde el punto de vista clínico se emplean para establecer el diagnóstico, estimar el pronóstico y seguir la progresión de determinadas enfermedades autoinmunes.<sup>1</sup> Desde el punto de vista patogénico, las investiga-

ciones de estos autoanticuerpos permiten identificar factores asociados con los trastornos de la regulación inmune presentes en las enfermedades autoinmunes e identificar nuevos mecanismos patogénicos.<sup>2</sup>

En la biología celular y molecular los autoanticuerpos se emplean para identificar moléculas que participan en diversos

procesos celulares como el procesamiento de proteínas, la citocinesis, la regulación génica y la apoptosis.<sup>3</sup> Los autoanticuerpos dirigidos contra antígenos intracelulares, y fundamentalmente contra antígenos nucleares, representan una característica fundamental de un grupo de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), el síndrome de Sjogren (SS), la enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), la polimiositis, la dermatomiositis y la artritis reumatoidea (AR).<sup>4</sup> Algunos de estos autoanticuerpos sirven como marcadores de la enfermedad y se emplean como parte de los criterios diagnósticos de esta; por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra el antígeno Sm y los que reconocen al ADN de doble cadena se incluyen en los criterios de LES;<sup>5</sup> la presencia de anticuerpos anti-U1 ribonucleoproteína es un criterio esencial para el diagnóstico de la EMTC<sup>6</sup> y son importantes los anticuerpos contra las moléculas Ro y La en el SS.<sup>7</sup>

El método de exploración más utilizado para la detección de anticuerpos antinucleares (AAN) es la inmunofluorescencia indirecta (IFI), para lo cual se emplean anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas marcados con fluoresceína y aplicados a cortes histológicos de hígado de rata. En los casos positivos se pueden identificar patrones de fluorescencia nuclear, los cuales sugieren determinada especificidad de los AAN que luego se corrobora mediante otras técnicas inmunológicas y el estudio clínico.<sup>8</sup> En el presente trabajo se evaluó la posibilidad de realizar el estudio inmunológico usando la técnica de inmunohistoquímica mediante el empleo de conjugados enzimáticos con peroxidasa (IP), para poder prescindir de la microscopia fluorescente en el diagnóstico de AAN en el suero, en los casos que no se disponga de recursos para apli-

car la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

## MÉTODOS

### – Controles y pacientes.

- Control positivo: para la estandarización de la técnica inmunohistoquímica mediante el empleo de conjugados enzimáticos se utilizó un suero proveniente de un paciente con AR, AAN positivo patrón granular grado IV que fue detectado por IFI.
- Control negativo: se empleó un suero de Banco de Sangre AAN negativo estudiado por IFI.
- Controles sanos: se emplearon 20 sueros de donantes del Banco de Sangre. En estos casos no se observaron alteraciones clínicas, por lo cual los sueros empleados se consideraron de sujetos supuestamente sanos.
- Pacientes: se estudiaron 80 pacientes con patologías autoinmunes, diagnosticadas por estudios clínicos y de laboratorio, entre las cuales 27 correspondían a LES, 27 a AR, 2 a vasculitis, 1 a púrpura de Schonlein-Henoch, 1 a EMTC, 1 a cirrosis biliar primaria y 21 con enfermedades autoinmunes aún no clasificadas.

### – Método analítico empleado.

En ambos casos (IFI e IP) se utilizaron fragmentos de hígado de rata que se congelaron en nitrógeno líquido y más tarde se realizaron cortes de 5 mm de grosor en un criostato. Los cortes fueron fijados con acetona 10 min para la mayor preservación del tejido.

- IFI: los cortes se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con suero humano diluido 1:10 y a continuación con anti-IgG fluoresceínada,

manteniendo igual tiempo de incubación; las preparaciones fueron observadas directamente en un microscopio de fluorescencia.

- IP: los cortes fueron incubados con suero diluido 1:10 durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente con anti-IgG conjugada con peroxidasa por el mismo espacio de tiempo. La reacción se reveló con diaminobencidina y las muestras fueron observadas al microscopio óptico.
- Procedimiento. Los resultados se informaron como positivos en los casos en que se observó tinción o fluorescencia nuclear, o ambas. La clasificación de los casos positivos se realizó de acuerdo con los patrones de reconocimiento nuclear, con grados desde I hasta IV en dependencia de la intensidad de la tinción, como:
- Difuso: tinción inespecífica en todo el núcleo.
  - Granular: tinción en forma de gránulos en el núcleo.
  - Periférico: tinción en la periferia nuclear.
  - Nucleolar: tinción localizada al nivel del nucleolo.
- Método estadístico.

Se realizó el cálculo de sensibilidad (S), especificidad (Sp) y valor predictivo positivo y negativo (vpp)(vpn) mediante una fórmula binomial y aplicando el teorema de Bayes. Se consideró un límite de confianza de 95 %, realizando los cálculos para la sensibilidad y la especificidad, por medio del método basado en la «distribución binomial exacta». Se realizó el cálculo de concordancia mediante la prueba de kappa.<sup>9</sup>

## RESULTADOS

La evaluación cualitativa de las preparaciones permitió establecer criterios de comparación entre ambos métodos, así la observación microscópica de las preparaciones por IP fue comparable a las realizadas por IFI, en cuanto a la determinación del patrón de expresión de los AAN.

Para informar los cálculos estadísticos realizados se empleó la fórmula binomial, basada en una tabla de contingencia (tabla 1).

Se aplicó el teorema de Bayes y los valores predictivos concuerdan con los mostrados anteriormente. Se calcularon intervalos de confianza a 95 % para la sensibilidad y la especificidad, utilizando el método basado en la distribución binomial exacta y la estimación para la especificidad fue de 86,29 y 99,51; y para la sensibilidad de

TABLA 1. Resultados encontrados con el método de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa en suero de pacientes con enfermedades autoinmunes

Inmunoperoxidasa	Inmunofluorescencia		total
	positivos	negativos	
positivos	30 (a)	2 (b)	32 (a + b)
negativos	0 (c)	48 (d)	48 (c + d)
total	30 (a + c)	50 (b + d)	80 (a + b + c + d)

$N = a + b + c + d = 80$  Sensibilidad (S) =  $a/a + c = 1 = 100\%$

Prevalencia (P) =  $a + c/N = 0,375$  Especificidad (Sp) =  $d/b + d = 0,96 = 96\%$

vpp =  $a/a + b = 0,937 = 93,7\%$  vpn =  $d/c + d = 1 = 100\%$

88,43 y 100,00. Se evaluaron además ambos métodos, mediante el cálculo de concordancia aplicando la prueba de kappa, donde resultó  $k = 0,947$  y este valor acusa una correlación muy buena.

Desde el punto de vista cuantitativo, al comparar los controles supuestamente sanos por el examen clínico (muestras del Banco de Sangre) entre las 2 técnicas, se pudo observar que 100 % de las muestras procesadas resultó negativo.

En la tabla 2 se muestra el diagnóstico clínico de los pacientes y los resultados de ambos métodos, donde puede apreciarse que la positividad/negatividad de 2 casos difiere en cuanto al método empleado.

En el análisis de los patrones de reconocimiento entre uno y otro métodos también se observó una elevada coincidencia en el diagnóstico (95 %), solo en 4 pacien-

tes se encontraron diferencias (tabla 3). Las diferencias fundamentales se observaron en cuanto a los patrones granulares y los difusos, en 3 de los casos por el método IP se pudo reconocer un patrón granular único. Sin embargo, por IFI se reconoció un patrón difuso o la combinación de este con granular. En el caso 4, el diagnóstico por IFI fue de granular y por IP fue de granular difuso.

## DISCUSIÓN

La comparación de los resultados del procesamiento de las muestras de suero por IFI e IP indica una coincidencia total en cuanto a muestras positivas, es decir, 100 % de los casos por IFI también lo fueron por IP. La  $S$  y  $S_p$  de IP fueron 100 y 96 % respectivamente, el vpp 93,75 % y vpn 100 %. Sin

TABLA 2. Muestras estudiadas y diagnóstico (positivo y negativo) según el método empleado

No. de pacientes	Diagnóstico	IFI (+)	IFI (-)	IP (+)	IP (-)
27	LES	11	16	11	16
27	AR	8	19	10	17
2	V	1	1	1	1
1	EMTC	0	1	0	1
1	CBH	0	1	0	1
1	P	0	1	0	1
21	EAI (SC)	6	15	5	15

LES: lupus eritematoso sistémico, AR: artritis reumatoidea, V: vasculitis, EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo, CBH: cirrosis biliar primaria, P: púrpura Schonlein Henoch, EAI (SC): enfermedades autoinmunes sin clasificar.

TABLA 3. Conducta de los patrones de reconocimiento nuclear según el método empleado para los pacientes con diferentes comportamientos

Paciente	Diagnóstico	IFI	IP
Caso 1	AR	difuso III	granular fino I
Caso 2	LES	difuso granular IV	granular IV
Caso 3	AR	difuso granular IV	granular IV
Caso 4	V	granular I	difuso granular IV

LES: lupus eritematoso sistémico, AR: artritis reumatoidea, V: vasculitis.

embargo, 2 casos diagnosticados clínicamente como artritis reumatoidea y que fueron negativos por IFI, resultaron positivos por IP (tabla 2), lo cual pudiera explicarse por una mayor sensibilidad de este último método en comparación con la IFI; esto se corresponde con las diferencias de sensibilidad descritas entre una y otra técnica.<sup>10</sup>

Las diferencias encontradas en el caso 4 de la tabla 3 indican que no se puede decir que se sigue una tendencia de reconocimiento en dependencia del método usado, a pesar de los pocos casos estudiados que muestran diferencias. No obstante, las diferencias encontradas en el patrón de reconocimiento inmunocitoquímico tiene solo un valor limitado en el diagnóstico y la confirmación clínica de las enfermedades reumáticas.<sup>11</sup> Además, desde el punto de vista diferencial, los patrones granular y difuso son muy semejantes, por lo que no es de extrañar el solapamiento entre ambos.

Los resultados de este trabajo discrepan con algunos reportes que plantean que no hay concordancia entre los obtenidos por uno u otro métodos.<sup>12</sup> Sin embargo, otros estudios sugieren la posibilidad de que el método de IFI puede ser sustituido por el de IP<sup>10,13,14</sup>, lo cual se corresponde con los hallazgos de la presente investigación.

Ambos métodos son de alta sensibilidad y especificidad y utilizan complejos antígeno-anticuerpo para observar los componentes celulares no detectables por téc-

nicas de rutina, por lo tanto, añaden una nueva dimensión al diagnóstico sobre la base morfológica en células y tejidos. Se emplean en la visualización de marcadores de diferenciación, productos sintetizados por las células y marcadores de activación y proliferación celular. Son cada vez más valiosos en el diagnóstico anatomopatológico como en neoplasias, enfermedades infecciosas, neurodegenerativas, cardiovasculares y también han demostrado ser muy útiles en la biología experimental.

La sustitución de la IFI por la IP desde el punto de vista práctico, también se apoya en el hecho de la posibilidad que brinda la IP de hacer estudios ulteriores al diagnóstico, porque a diferencia de la IFI, las muestras estudiadas por IP no se desvanecen y perduran por tiempo indefinido. Lo anterior también presupone que el diagnóstico se pueda realizar prescindiendo del microscopio de fluorescencia, lo cual además abarata la metodología de estudio.

Teniendo en cuenta la elevada coincidencia entre los resultados que brinda la IFI y la IP, se puede concluir que la aplicación del método de IP, para la detección de AAN resulta factible, y por constituir un método más económico, se propone puede ser aplicado en los laboratorios que no dispongan de los recursos necesarios para la realización del diagnóstico de enfermedades autoinmunes, por la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

## SUMMARY

A total of 100 sera from patients with autoimmune diseases and sound individuals were indistinctly studied by the methods of indirect immunofluorescence (IIF) and the immunohistochemical technique by using enzymatic conjugates with peroxidase (IP) in order to detect antinuclear antibodies (ANA). The results of the study of each sample by IIF and IP were compared taking into account their positivity or not, as well as the marking pattern presented by the positive cases. The sensitivity and specificity studies showed an elevated index of reliability. Taking into account the high concordance between the IIF and IP studies, it was concluded that the application of the IP method for the detection of ANA is feasible, and that as it is more sensitive and economic than the IFI, it is recommended as the election method.

*Key words:* Antinuclear antibodies, immunoperoxidase, immunohistochemistry, indirect immunofluorescence.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fritzler MJ. Autoantibodies: diagnostic fingerprints and etiologic perplexities. *Clin Invest Med* 1997;20:5046.
2. Fritzler MJ, Salazar M. The diversity and origin of rheumatologic autoantibodies. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:256-69.
3. Tan E.M. Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell* 1991;67:841-2.
4. ———. Antinuclear antibodies: markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989;4:93-151.
5. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Von Muhlen CA. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
6. Alarcón-Segovia D, Cardiel M.H. Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease: study of 593 patients. *J Rheumatol* 1989;16:328-34.
7. Chan EKL, Andrade LEC. Antinuclear antibodies in Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:551-70.
8. Von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of rheumatic diseases. *Sem Arthritis Rheumat* 1995;24:323-58.
9. Argote E, López G. Pautas para evaluar la calidad de los juegos diagnósticos basados en la técnica ELISA. *Rev Cubana Cienc Vet* 1995;24(2):16-9.
10. Fritzler MJ, Tan EM. Antinuclear antibodies and the connective tissue diseases. *Lab Diagn Procedures Rheum Dis* 1985;8:207-47.
11. Chen RY, Wong KL, Lawton JW, Ho FC. Antinuclear antibody detection using streptavidin-biotin-peroxidase complex on Hep-2 cell substrate. *Asian Pac Allergy Immunol* 1992;10(1):19-24.
12. Nalesnik MA, Rabin BS. A comparison of indirect immunofluorescence and the avidin-biotin-peroxidase conjugated technic (ABC) in the performance of the antinuclear antibody test. *Am J Clin Pathol* 1984;81(2):192-7.
13. Nielsen CM, Hansen K, Andersen HM, Gerstoft J, Vestergaard BF. A biotin-avidin-amplified inhibition enzyme immunoassay for detection of CMV antibodies in human serum. *J Virol Methods* 1987;16(3):195-208.
14. Mahakittikun V, Wongkanchai S, Sittapairochana C, Suthipinitharm P, Chaihirankarn S, Udompuntirak S. Indirect immunoperoxidase staining of *Crithidia licidiae* for detecting anti-dsDNA: comparison with other serodiagnostic tests. *Asian Pac Allergy Immunol* 1997; 15(1):35-40.

Recibido: 3 de febrero de 2004. Aprobado: 14 de mayo de 2004.

Dra. *Mercedes Meléndez Minobis*. Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales. Centro de Investigaciones Biomédicas. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas «Victoria de Girón». Ave 146 y 31. Playa. 11600. Ciudad de La Habana. Cuba. Teléf.: 2084877-2717686, correo electrónico: mercedes.melendez@infomed.sld.cu